

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE NUTRICIÓN

**Efecto de la tartracina sobre el tejido cerebral y
función cognitiva en ratas de segunda generación**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición

AUTOR

Saori Denisse Matayoshi Rodríguez

ASESOR

Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Lima - Perú

2017

DEDICATORIA

A Dios y a Santa Rosa de Lima quienes me brindaron fuerzas en los momentos más difíciles y en el camino colocaron ángeles que me ayudaron en la realización de la tesis.

A mis padres, que realizaron un gran esfuerzo por verme crecer a nivel profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Mg Oscar Huamán Gutiérrez, por aceptarme como su tesista y brindarme todo su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

Al Centro de Investigación y Bioquímica, por permitirme ejecutar la tesis.

Al Instituto de Patología de la UNMSM, Dr. José Ernesto Raez Gonzales por el apoyo y asesoramiento en las lecturas y por su gran amabilidad y carisma.

A mis hermanas que siempre han estado en los momentos difíciles.

A mis tíos de cariño, que han apoyado a mi familia y a mí en cada momento, bueno y malo.

A mis amigas Ruth Chahua, Velia Bueno, quienes siempre estuvieron dispuestas a darme una mano en cualquier momento.

A cada persona que me brindo su tiempo, consejo y apoyo para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	11
1.1 Hipótesis:	11
2.2 Objetivo General:	11
2.3 Objetivos Específicos:	11
II. METODOLOGÍA	12
2.1 Tipo de Estudio	12
2.2 Materiales	12
2.3 Variables	13
2.4 Obtención y preparación de la solución de Tartracina	15
2.5 Condicionamiento de la unidad de análisis	15
2.6 Evaluación de aprendizaje y memoria	16
2.6.1 Aprendizaje	17
2.6.2 Memoria	17
2.7. Determinación de los Marcadores de Estrés Oxidativo	18
2.7.1 Determinación de Glutación (GSH)	18
2.7.2 Determinación de Lipoperoxidación:	19
2.8 Estudio Histopatológico	21
2.9. Análisis de datos	22
2.10. Consideración Ética	22
III. RESULTADOS	23
3.1. Consumo promedio de solución de tartracina	23
3.2. Aprendizaje	23
3.3 Memoria	24
3.3 Marcadores de estrés oxidativo	25
3.4 Estudios histopatológicos del tejido nervioso	26
IV. DISCUSIÓN	31
V. CONCLUSIONES	38
VI. RECOMENDACIONES	38
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS	39
VIX. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Definición operacional de variables..... 14

Tabla 1: Tiempo de latencia y tiempo de permanencia en la prueba de Laberinto de Morris realizada a las ratas de segunda generación..... 24

Tabla 2: Glutación (GSH) y Lipoperoxidación en homogenizado de cerebro de ratas de segunda generación según grupo de tratamiento..... 25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cuadrantes del Laberinto acuático de Morris	16
Figura 2: Reacción de TBA con 2 MDA	20
Figura 3: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo I (sin tratamiento).....	26
Figura 4: Microfotografía en la zona límbica del grupo I (sin tratamiento).....	26
Figura 5: Microfotografía del cerebelo del grupo I (sin tratamiento).....	27
Figura 6: Microfotografía del cerebelo del grupo II (0,1 %).....	28
Figura 7: Microfotografía del cerebelo del grupo II (0,1 %).....	28
Figura 8: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo II (0,1 %)	28
Figura 9: Microfotografía del cerebelo del grupo III (1,0 %)	29
Figura 10: Microfotografía del cerebelo del grupo II (1,0 %).....	30
Figura 11: Microfotografía del cuerno de Amón del grupo III (0,1%).....	30

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto del colorante azoico tartrazina sobre el tejido de cerebro y cerebelo, así como en la función cognitiva en ratas de segunda generación. **Diseño:** Experimental. **Materiales:** Ratas hembras preñadas y sus crías y tartrazina (E102). **Metodología:** Se emplearon 12 ratas preñadas de 7 días de gestación, con un peso promedio de 257,5 g y sus respectivas crías. Las ratas preñadas fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos y acondicionadas aclimatadas en jaulas, las cuales recibieron los siguientes tratamientos por vía oral en sus bebederos: grupo I: solución glucosada, grupo II: solución de tartrazina 0,1 %, grupo III: solución de tartrazina 1,0 %, el consumo fue *ad libitum*. El tratamiento fue recibido durante la gestación hasta el destete de sus crías, (28 días de nacidas), luego las madres fueron retiradas y las crías recibieron las respectivas soluciones que habían recibido de la madre. Concluidos el tratamiento se realizó la prueba de Laberinto de Morris por cuatro días y se procedió al sacrificio de los animales para evaluar los niveles de lipoperoxidación y GSH, además de cambios histopatológicos de tejido de cerebro y cerebelo. **Resultados:** El tratamiento de tartrazina al 1% disminuye de manera significativa los niveles de GSH y aumenta los niveles de lipoperoxidación ($p < 0,05$), en cuanto a la prueba de Morris, se observó mayor tiempo de latencia en el grupo III ($p < 0,05$), mientras que el tiempo de memoria en los tres grupos no mostró diferencias significativas. En relación a los cambios histológicos se observó en cerebro edemas de mayor severidad en los grupos II y III, y mientras que en cerebelo hubo una disminución de las células de Purkinje. **Conclusión:** De lo observado en el presente estudio de investigación se infiere que la administración de tartracina produce un daño en la función cognitiva y el tejido cerebral (medidos por estrés oxidativo e histológico) en los tejidos de ratas de segunda generación en las concentraciones empleadas.

Palabras Clave: Tartracina, Glutation, Lipoperoxidación, Laberinto de Morris, Cambios histológicos, memoria, aprendizaje.

ABSTRACT

Objective: Determine the effect of tartrazine azo dye on brain and cerebellum tissue, as well as on cognitive function in second generation rats. **Design:** Analytical, transversal, experimental and prospective study. **Materials:** Rats (Holtzman) pregnant females and their offspring and tartrazine (E102). **Method:** Twelve pregnant rats of 7 days' gestation of the Holtzman breed with an average weight of 257.5 ± 32.5 g and their respective offspring were used. Pregnant rats were randomly distributed in three groups and conditioned acclimatized in cages, all groups received the same balanced diet and water ad libitum. They received the following oral tartrazine treatments: Group I: Tap water, Group II: Concentration of tartrazine 0.1%, Group III: Concentration of tartrazine 1.0%, tartrazine in water was diluted in all groups Tap with 5% glucose ad libitum. The treatment was received during gestation until the weaning of their offspring (28 days of birth) on the day the mother was removed and after weaning the offspring received the respective solutions they had received from the mother for a period of 28 days, Then the Morris Labyrinth test was performed for 4 days and the animals were sacrificed to evaluate the levels of lipoperoxidation and GSH, as well as histopathological changes in brain and cerebellum tissue. **Results:** Treatment of 1% tartrazine significantly reduced GSH levels and increased levels of lipoperoxidation ($p < 0.05$), as for the Morris test, a longer latency time was observed in group III $P < 0.05$, whereas the memory time in the three groups did not show significant differences. In relation to the histological changes were observed in brain edemas of greater severity in groups II and III, and whereas in cerebellum there was a decrease of Purkinje cells. **Conclusion:** From the findings of the present study it is inferred that administration of tartrazine causes damage to cognitive function and brain tissue (as measured by oxidative and histological stress) in the tissues of second generation rats at the concentrations used

Key Words: Tartracin, Glutathione (GSH), Lipoperoxidation, Morris water maze, Histological changes.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años se han observado cambios en la diversificación de la dieta, no solo debido al aumento en la ingesta de verduras, frutas y alimentos de origen animal, sino también al aumento súbito y acelerado de alimentos industrializados.⁽¹⁾ En la población, principalmente infantil, el consumo de refrescos, jugos naturales de frutas y sobretodo el agua han sido desplazados por refrescos en polvo así como embotellados, los cuales contiene saborizantes y colorantes que intentan parecerse exageradamente al color y sabor de las frutas.⁽²⁾⁽³⁾

Espinosa et al., analizaron el contenido, según etiqueta, de 224 productos, como refrescos y golosinas, procedentes de los hipermercados de Granada (España). Encontraron que los aditivos más utilizados, en general, sin considerar los aromas, que serían los más empleados, fueron los colorantes en un 43 %. En el 63% de los caramelos se encontró ácido cítrico y el 60% presentaron colorantes, entre los más frecuentes se halló a la tartracina, correspondiente al E-102 según la codificación Europea designada para los aditivos⁽⁴⁾, este colorante, perteneciente a la familia de los azoicos, es utilizado en una gama de alimentos industrializados e incluso en la industria farmacéutica y otros productos industriales.^(5,6)

Según el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos considera una ingesta admisible (IDA) de 7,5 mg/kg, de la tartracina o amarillo FD&C No. 5, valor que fue establecido en la octava reunión del comité de expertos. (1964).^{(7) (8) (9)}

En el 2006 la FDA informó que las combinaciones de colorantes en la dieta, tales como rojo allura, tartracina, amarillo ocaso, amaranto y azul brillante son ampliamente utilizadas en la fabricación de alimentos. Park et al., realizaron un estudio experimental en el cual evaluaron la toxicidad de cada colorante y la combinación de los mencionados por la FDA, evaluando la toxicidad en la célula progenitora neural y la neurogénesis. La combinación de los colorantes, tartracina y azul brillante disminuyeron significativamente el número de células recién generadas en el hipocampo del ratón adulto, lo que indicaría potentes acciones adversas sobre la neurogénesis a nivel del hipocampo⁽¹⁰⁾.

En los últimos 50 años, la tasa de consumo de bebidas gaseosas en Estados Unidos ha aumentado en un 500% per cápita, siendo la principal fuente de azúcar extra en la dieta de un adolescente. ⁽³⁾

Investigaciones realizadas acerca de aditivos y colorantes demuestran un creciente uso en los alimentos y bebidas, y se estima una producción de 750 000 a 800 000 toneladas al año a nivel mundial entre colorantes y pigmentos ⁽¹³⁾.

En nuestro país, la industria de bebidas, presentan una tendencia creciente en su producción, una de ella son las gaseosas, una mixtura de colorantes y jarabe de maíz reunidos en una botella, disponible casi para toda la población y de consumo en todas las edades, mostrando un crecimiento de 125% entre los años 1996 y 2002, llegando en el a un consumo de 33,3 litros per cápita, en Lima metropolitana en el año 2008. ⁽¹⁴⁾

Este mismo año, la Asociación Peruana de Consumidores y Usuarios, evidenció que el 81% de niños entre 6 a 10 años procedentes de diversos colegios de Lima elegían productos no saludables, expendidos en los quiscos escolares ⁽¹⁵⁾, caracterizadas por exceso de sal, azúcares, grasas *trans*, grasas saturadas y una variedad de preservantes y colorantes ⁽¹⁶⁾.

En enero del 2012, DIGESA emitió un comunicado acerca del uso de la tartracina, ellos exigen que este colorante sea rotulado de forma específica, clara, indubitable y en negrita en la lista de ingredientes de alimentos industrializados. ⁽¹⁷⁾

La comisión del CODEX ALIMENTARIUS (FAO/OMS) define al aditivo alimentario como toda sustancia que no constituye un alimento por sí mismo, ni posee valor nutritivo, el cual se adiciona intencionalmente al alimento con fines de modificar sus características físico químicas, incluidas las organolépticas. ⁽¹¹⁾ Su uso está justificado si ello ofrece alguna ventaja, como conservar la calidad nutricional del alimento o aumentar su calidad de conservación, dándole estabilidad al alimento para mejorar sus propiedades organolépticas sin alterar su naturaleza ni que engañe al consumidor. El aditivo puede proporcionar ayuda en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento del alimento. ⁽¹²⁾

Las primeras investigaciones de la tartracina, fueron estudios relacionados con la hipersensibilidad alérgica, Lockey en 1948 reportó casos de urticaria y asma ⁽¹⁸⁾, luego en 1959 informó sobre los primeros casos de reacciones secundarias a la ingesta de medicamentos (corticoesteroides) que contenían tartracina⁽¹⁹⁾, en adelante se han publicado una serie de trabajos indicando que estos colorantes pueden producir reacciones alérgicas diversas, tales como: asma, urticaria, edema angioneurótico, prurito, erupciones fijas por drogas, púrpura no trombocitopénica y anafilaxia.

Existe una relación muy estrecha entre la tartracina y la aspirina, esto debido a las semejanzas que presentan en su estructura química. Se realizó un análisis sobre el rol de la Inmunoglobulina E (Ig E) tras el consumo de la aspirina y la tartracina, en este estudio se pudo evidenciar que los niveles de Ig E no se vieron alteradas después de la exposición de las sustancias en estudio, por ello no se le considera una alergia en sí, cuando se habla de la tartracina se menciona de una pseudoalergia en el cual hay liberación de histamina por los mastocitos generando toda la sintomatología característica de una alergia, mas no se elevan los niveles Ig E.⁽²⁰⁾

El color es la primera sensación percibida de un alimento y por tanto una característica organoléptica fundamental que se considera a la hora de elegirlos, incluso puede influir en el sabor y el olor, un ejemplo de ello en la actualidad son las conservas de alimentos, que sin los colorantes resultarían poco apetitosos para el público. Debido a la importancia en el aspecto de los alimentos, es la razón del porqué los colorantes alimentarios tienen un papel tan relevante entre los aditivos y en ello se basa la justificación de su uso. Resaltar el color natural de los alimentos o devolver el color perdido durante la manipulación y su conservación.⁽²¹⁾⁽²²⁾ Entonces el colorante alimentario es un tipo de aditivo que tiene como finalidad proporcionar color al alimento, en caso del colorante E-102, un color que va del anaranjado hasta el amarillo dependiendo de su concentración.⁽¹⁴⁾

La tartracina es un colorante artificial perteneciente a la familia de los colorantes azoicos que consiste esencialmente por la sal trisódica del ácido *5-hidroxi-1-(4-*

sulfonatofenil)-4-(4-sulfonato-fenilenilazo)-H-pirazol-3-carboxilato de metilo y otros colorantes secundarios, junto con cloruro sódico o sulfato sódico como principales componentes incoloros ⁽²³⁾.

El color característico de los colorantes azoicos se caracterizan por un grupo cromóforo específico ($-N = N-$) o azo enlace, el cual deriva de un sistema conjugado que facilita la deslocalización de electrones π , dando lugar a la absorción de energía en longitudes de onda selectivas en el espectro visible, esto permite la síntesis de un gran número de colorantes azoicos, de gran intensidad y variedad de color. ⁽²⁴⁾

Los colorantes azoicos se preparan principalmente diazotando aminas aromáticas primarias y acoplando las sales de diazonio con fenoles o aminas aromáticas. ⁽²⁵⁾ El proceso de diazotación consiste en una reacción entre una amina primaria aromática y nitrito de sodio (NaNO_2) en presencia de un medio ácido, el cual puede ser ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4) para formar una sal de diazonio. Estos compuestos son indispensables intermediarios para la formación de pigmentos azo y son muy útiles para reemplazar un grupo amino por un grupo hidroxilo, halógeno. ⁽²⁷⁾

La cantidad de NaNO_2 está en proporción estequiométrica con la amina, pero el HCl debe estar en exceso para prevenir la diazotación parcial y condensación. Una diazotación satisfactoria, es cuando la amina se encuentra en disolución acuosa ácida. Las reacciones de diazotación generalmente son exotérmicas y las sales de diazonio se descomponen con facilidad si no se enfría el sistema y se las hace reaccionar en el tiempo establecido, por ello es necesario que se mantenga la temperatura de $0 - 5^\circ\text{C}$. ⁽²⁶⁾

Las sales de diazonio reaccionan con una gran cantidad de compuestos copulantes, como compuestos cromáticos hidroxilo, aminas aromáticas, sustancias reactivas que contengan grupos metileno, fenol, éteres de naftol e hidrocarburos, mientras que las reacciones de copulación generalmente se efectúan a temperatura ambiente o por debajo de ella, normalmente entre $10-20^\circ\text{C}$. Una vez formado el azo compuesto se filtra, se lava el compuesto con agua y finalmente se seca. Los grupos donadores y

aceptores de electrones del anillo aromático, en la estructura del colorante, afectan significativamente la reacción de acoplamiento o copulación a través de efectos inductivos y de resonancia. ⁽²⁷⁾

En cuanto al metabolismo de la tartracina, se ha descrito este proceso en ratas, conejos e incluso en hombres; Daniel J.W. (1962) realizó una investigación con 11 colorantes de origen azoico en el cual evidenció que solo un pequeño porcentaje de los colorante administrados se excretó por la orina después de la administración oral, del 60 al 80% fueron componentes como aminas y derivados resultantes de la reducción del enlace azo. En la muestra de orina de 48 horas, después del consumo de tartracina se encontró los siguientes productos: tartracina (1%) ácido sulfanílico (74%), ácido p-acetamidobencenosulfonilo (22%), también se identificó el colorante en bilis sin embargo esta fue una pequeña cantidad. ⁽²⁸⁾

Ese mismo año Radomski y Melliger (1962) también estudiaron el metabolismo de los colorantes azoicos (FD&C Red N°. 2, FD&C Red N°. 4, and FD&C Yellow N°6) donde hallaron aminas en orina, mientras que en las heces no se identificó ninguno de los colorantes en estudio y para verificar si estos colorantes son reducidos por la flora intestinal, se sometió a las ratas a un tratamiento de antibióticos (sulfato de neomicina y clorhidrato de tetraciclina) después de 14 días se analizaron las heces, en donde se observó un aumento de los colorantes de forma intacta. El total de excreción biliar y urinaria se acercó casi al 100% de la cantidad del colorante infundido, por tanto la facilidad y la rapidez de la reducción de estos colorantes azoicos solubles en agua y las cantidades relativamente pequeñas absorbidas, indican que la mayor parte de este colorante se reduce por la flora bacteriana. Además, el estudio demuestra que la azo reductasa en el hígado es cuantitativamente poco importante, y que la fuente de los productos de reducción que se encuentra en la orina y en la bilis es la absorción desde el intestino después de que el colorante se reduce por la flora bacteriana. ⁽²⁹⁾

Jones R. et al., (1964), demostraron que los productos de la tartracina dependen de la vía de administración, después de la inyección intraperitoneal, se identificó el colorante de forma intacta en orina de 24 horas en rata como en conejos, en

comparación a la vía oral se observó gran cantidad de ácido sulfanílico en la excreción urinaria de 24 horas y en la orina de 48 horas en rata, conejo y en el hombre. Los resultados de este estudio muestran que se puede reducir la tartracina cuando se administra oralmente, pero no cuando se administra mediante inyección intraperitoneal, por lo tanto, que la reducción de este compuesto se lleva a cabo por la flora intestinal. Los resultados del estudio mostraron algunas excepciones, cuando la administración oral del colorante fue en altas dosis (el cual solo se experimentó en el conejo) se evidenció un porcentaje (8,2%) de tartracina intacta en la orina. ⁽³⁰⁾

En 1999, Neil et al., realizaron un estudio con niños hiperactivos para evaluar el estado del zinc y el efecto de la tartracina sobre este nutriente. Se observó la influencia del colorante sobre el estado del zinc en suero sanguíneo, cabello de la cabeza lavada, orina, saliva y uñas de los niños hiperactivos. Los resultados fueron una disminución en las concentraciones séricas y un aumento en el contenido de zinc urinario. Se observó deterioro en el comportamiento correspondiente a las respuestas emocionales de los niños hiperactivos ⁽³¹⁾. Se ha relacionado también a la tartracina con la disminución de la actividad de la vitamina B₆ en las vías metabólicas, tales como en el metabolismo del triptófano - serotonina, donde se genera un sistema disfuncional de la serotonina, ello podría explicar el efecto de la tartracina sobre los trastornos de ansiedad y depresión⁽³²⁾.

La tartracina es un colorante que se ha visto envuelto de polémica por diversos estudios, los efectos carcinogénicos y mutagénicos, han sido estudiados por diferentes autores. Uno de los estudios menciona que la tartracina puede ocasionar aberraciones cromosómicas en fibroblastos⁽³³⁾, mientras que en otro estudio se evaluó la genotoxicidad de 39 sustancias químicas utilizadas actualmente como aditivos alimentarios, las cuales cumplen diversas funciones: fijadores de color, conservantes, antioxidantes, fungicidas, edulcorantes y colorantes, entre estos últimos se evaluó la tartracina. Dando como resultado una lista de los colorantes más genotóxicos, dentro los cuales estaba la tartracina, induciendo daños en el DNA de los órganos gastrointestinales ⁽³⁴⁾.

Actualmente se han realizado estudios experimentales, que asocian el trastorno de hiperactividad con el alto consumo de aditivos alimentarios, especialmente los colorantes. La tartracina es uno de los colorantes más investigados por su relación con este trastorno, se ha evidenciado el efecto toxicológico del colorante sobre las principales conductas para los modelos de los trastornos del sistema nervioso central, tales como la ansiedad, la depresión y el comportamiento social. Los animales tratados con soluciones de tartracina a diferentes concentraciones, mostraron hiperactividad, ansiedad y comportamientos similares a la depresión. El estudio postula que la hiperactividad inducida por tartracina podría explicarse por la propiedad quelante del colorante con el zinc. Mervat e Heba demostraron en el 2011, que el agotamiento de zinc es una de las potenciales causas de hiperactividad infantil después de la exposición a la tartracina ⁽³⁵⁾.

En 1979, Coleman et al., relacionaron fuertemente el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) con nutrientes como la piridoxina (Vitamina B₆), ⁽³⁶⁾ zinc y hierro; estos nutrientes son conocidos por desempeñar numerosas actividades en la función cerebral a través de la actividad enzimática, unión de proteínas y la neurotransmisión. Se ha comprobado que la deficiencia del hierro, se relaciona con un mal desarrollo cognitivo y el comportamiento a través de su rol como cofactor de la tirosina hidroxilasa, esta es una enzima limitante de la velocidad de reacción implicada en la síntesis de la dopamina ⁽³⁷⁾. También debemos referir que se ha reportado niveles bajos de magnesio en niños con TDAH ⁽³⁸⁾.

Un radical libre es un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado en su orbital más exterior, dicho electrón hace que presente una alta inestabilidad química confiriéndole reactividad oxidante para otras especies químicas que se encuentren cercanas las cuales reaccionan rápidamente con esta especie química ⁽³⁹⁾. Los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como ser partícipes en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y también favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis.⁽⁴⁰⁾ Los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) son normalmente generados por el

metabolismo celular para la obtención de energía y son producidos durante el metabolismo aerobio para ser utilizados en diversos procesos fisiológicos como mecanismo de defensa contra agentes infecciosos ; sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas, capaces de dañar a las diversas biomoléculas de nuestras células, por ello el cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes (RL y ROS) y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno, lleva a un estado de estrés oxidativo, caracterizado niveles elevados de radicales libres y especies reactivas. ⁽⁴¹⁾

Se conoce que los radicales libres, oxidan a los aminoácidos, que constituyen a las proteínas produciendo diversas modificaciones, ocasionando que las proteínas sufran cambios en su estructura, actividad y funcionalidad, provocando que las proteínas que sufren el daño oxidativo presenten un deterioro en la actividad hormonal y enzimática.⁽⁴²⁾ Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) el cual conforman la parte esencial de los fosfolípidos que forman la capa bilipídica de las membranas dándole fluidez, al ser oxidados por los radicales libres dan lugar a la lipoperoxidación, una reacción en donde los PUFA ceden sus electrones a los radicales libres. Este efecto provoca el mayor daño a la célula al producir cambios en la estructura molecular de la membrana, agregado a ello la formación de puentes disulfuro de las proteínas de membrana, dan como resultado la pérdida de permeabilidad y estabilidad de la membrana, provocando la muerte celular. ^(42,43)

Los radicales libres también atacan al DNA, dañando a los genes que codifican a las proteínas necesarias y lleven a cabo todas las funciones celulares, se sabe que el daño oxidativo sobre el DNA producido específicamente por el $\text{OH}\cdot$, conduce a diversas modificaciones, principalmente en la desoxirribosa, provocando una liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar. Lo anterior produce el rompimiento de una o ambas cadenas ocasionando la pérdida de un fragmento de DNA en el cromosoma, dando como resultado mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes, que afectan

incluso la biosíntesis de cadenas de DNA. Además el estrés oxidativo produce errores durante la transcripción y traducción del RNA. ⁽⁴⁴⁾

Los radicales libres también pueden originarse a partir de contaminantes ambientales y del consumo de ciertos alimentos, lo que incrementa su concentración en las células, causando un estado de estrés oxidativo; estudios demuestran que la tartracina también puede ocasionar este estado. Una investigación sobre el efecto tóxico de la tartracina junto a la carmoisina sobre la función renal, hepática, perfil de lípidos, glucosa en sangre y biomarcadores de estrés oxidativo en el tejido hepático y renal, mostraron un aumento significativo en alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), urea, proteínas totales y albúmina, creatinina, en suero de ratas tratadas con ambos colorantes, los cambios más significativos se evidenciaron con mayor claridad en las dosis más altas, mientras que el glutatión (GSH), superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa disminuyeron y malondialdehído (MDA) aumentó en el homogeneizado de tejido en ratas con el tratamiento de dosis alta de tartracina y carmoisina, es decir estos colorantes afectaron y alteraron negativamente los marcadores bioquímicos en hígado y riñón ⁽⁴⁵⁾.

El 2011 una investigación relacionó al colorante E-102 (tartracina) con la disminución de enzimas antioxidantes en testículos de ratas, se observó la disminución de la actividad de 4 enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) al igual que los niveles de sus cofactores. Concluyendo que la tartracina es capaz de producir radicales libres, alterando de esta manera la defensa antioxidante en el tejido testicular y causando daños en el sistema de compartimento celular de testículos de rata ⁽⁴⁶⁾. Asimismo se ha observado la disminución de actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPHx), superóxido dismutasa (SOD), así como un aumento en el nivel de malondialdehído (MDA) en el cerebro de ratas tratadas con tartracina, estos resultados se asociaron con el daño oxidativo que causa el colorante en el cerebro de estos animales⁽⁴⁷⁾.

El 2013 se reportó el efecto citotóxico de la tartracina, para lo cual se utilizó 10 mL del colorante por 2 kg de masa (bulbo de cebolla), demostrando una disminución significativa en el índice mitótico del bulbo de *Allium cepa* L. a las 48 horas de exposición con la tartracina, igualmente fue significativo el número de aberraciones cromosómicas en comparación con el grupo control ⁽⁴⁸⁾. Ese mismo año un estudio por la Academic Journal investigó el efecto citotóxico del colorante artificial tartracina y el efecto protector de la Vitamina C en la mitosis del DNA y RNA contenido en las raíces y en el patrón de bandas de proteínas en las semillas del *Allium cepa*. Los resultados mostraron un efecto marcado en la reducción de los valores del índice mitótico, los cuales se redujeron progresivamente a medida que las concentraciones y duración de los tratamientos se incrementaron. Además de la reducción del índice mitótico, el colorante provocó un cambio en las frecuencias de las diferentes etapas mitóticas en todas las concentraciones utilizadas. También se observó que el porcentaje de anomalías cromosómicas mitóticas alcanzó un porcentaje de 96,44%, en el grupo con la mayor concentración de la tartracina. ⁽⁴⁹⁾

Moutinho et al., (2007) evaluaron el efecto inflamatorio, atrófico, atípico, metaplasia, displasia y cambios carcinogénicos en la mucosa gástrica. Un grupo de ratas recibieron un tratamiento de 7,5 mg/kg/día de tartracina junto con agua potable *ad libitum*, en el cual se observó un aumento significativo en el número de linfocitos y eosinófilos de la mucosa del antro mas no hubieron cambios cancerígenos en la zona gástrica durante el estudio ⁽⁵⁰⁾.

I. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.1 Hipótesis:

- La administración peroral de la tartracina tiene efecto negativo sobre el tejido cerebral y la función cognitiva en ratas de segunda generación.

2.2 Objetivo General:

Determinar el efecto de la tartracina sobre el tejido cerebral, cerebelo y la función cognitiva en ratas de segunda generación.

2.3 Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto de la tartracina sobre los marcadores del estrés oxidativo en el tejido de cerebro de ratas de segunda generación.
- Determinar el efecto de la tartracina sobre la función cognitiva en ratas de segunda generación.
- Determinar el efecto de la tartracina sobre la morfología del tejido cerebral y del cerebelo en ratas de segunda generación.

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de Estudio: Según Argimon (Argimon JM, Jiménez J.2004) ⁽⁵¹⁾

Según su finalidad: Analítico

Por la secuencia de estudio: Transversal.

Por el control de la asignación de los factores de estudio: Experimental

Por el inicio del estudio en relación con la cronología: Prospectivo

.

2.2 Materiales:

2.2.1 Materiales Biológicos

- Ratas (Holtzman) hembras preñadas y sus crías.

2.2.2 Reactivos

- Tartracina (Colorante E-102): *Montana SA*
- 5, 5- ácido ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Reactivo de Ellman
- Formaldehido *Spectrum Chemical mfg corp*
- Ácido *tricloroacético Mallin ckrodt AR/Lab Guard*
- Ácido *2-tiobarbiturico Merck*
- Trizma base *Sigma- Aldrich T- 1503*

2.2.3 Equipos

- Balanza Analítica modelo RADWG; modelo:WTB200
- Homogenizador marca: Ultra-Turraz; modelo: IKA – T10BASIC
- Espectrofotómetro marca: GREETMED; modelo: NV203
- Centrifuga marca: GREETMED; modelo: GTT119-300
- Baño María marca: AVALIER; modelo: VL-32
- Piscina circular (150 cm x 52,5 cm)
- Plataforma de plástico (20 cm x 10 cm x 30 cm)

2.3 Variables

2.3.1 Variable Independiente:

Ingesta de Tartracina:

Consumo del colorante azoico de origen artificial presente en la bebida, el cual fue consumido *ad libitum*.

2.3.2 Variable Dependiente:

Efecto sobre el tejido cerebral y cerebelo

Cambio a nivel estructural del tejido de cerebro y cerebelo.

Efecto sobre la función cognitiva:

Cambios en las pruebas realizadas para evaluar memoria y aprendizaje, considerando el aprendizaje como un proceso de cambio en el estado de conocimiento del sujeto y en sus capacidades conductuales, por tanto se considera un proceso de adquisición mediante el cual se incorporan nuevos conocimientos, nuevas conductas y formas de reaccionar al ambiente en cuanto a la memoria también se le considera como un proceso dinámico de uso y mantenimiento de la información. ⁽⁵²⁾

2.3.3 Las variables a controlar:

Se consideró la edad, peso, alimentación, temperatura, luz y aspectos generales de los animales de experimentación.

Definición operacional de variables

Variables	Dimensiones	Indicadores	Categorías / Punto de Corte	Escala de Medición
Variable Independiente				
Ingesta de Tartracina: Consumo del colorante azoico de origen artificial presente la bebida y consumido <i>ad libitum</i> .		Concentración de Dosis	Cuantitativa 0,1 % 1,0 %	De Razón
Variable Dependiente				
Efecto sobre el tejido cerebral y cerebelo Cambio a nivel estructural del tejido de cerebro y cerebelo.	Estrés Oxidativo	Glutación (GSH)	Cuantitativa	Continua
		Lipoperoxidación		
	Morfología	Estudio Histopatológico	Cuantitativa y Cualitativa	
Efecto sobre la función cognitiva: Cambios en las pruebas realizadas para evaluar memoria y aprendizaje. (52)	Función cognitiva	Aprendizaje	Tiempo de latencia	Continua
		Memoria	Tiempo de permanencia	Continua

2.3.4 Prueba piloto:

Para este estudio se realizó una prueba piloto, donde se identificó problemas de aceptación en la solución de alta concentración.

También se pudo identificar los mejores métodos para la manipulación de las ratas de segunda generación (crías) en los primeros días de vida.

2.4 Obtención y preparación de la solución de Tartracina

La tartracina (colorante E-102) se obtuvo de la casa comercial Montana S.A.

Las características se describen en el (ANEXO 1)

Se prepararon dos soluciones de tartracina, al 0,1% y 1% en solución glucosada al 5%, cuyo solvente fue agua potable.

2.5 Condicionamiento de la unidad de análisis

Se emplearon 9 ratas preñadas de raza Holtzman con siete días de gestación con un peso promedio de $257,5 \pm 32,5$ g. Fueron adquiridas del Centro de Producción de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud.

Las ratas preñadas fueron aclimatadas en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aislados y aclimatadas en jaulas a una temperatura de 22°C (± 3) con ciclos de alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso libre alimento balanceado proveniente del Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

Transcurrida la aclimatación, fueron distribuidas aleatoriamente en 3 grupos recibiendo el siguiente tratamiento:

Grupo I: Glucosa al 5% cuyo solvente fue agua potable *ad libitum*

Grupo II: Tartracina 0,1 % en glucosa 5% con agua potable *ad libitum*

Grupo III: Tartracina 1,0 % en glucosa 5% con agua potable *ad libitum*

El tratamiento fue recibido por la madre durante la gestación hasta el destete de sus crías, (28 días de nacidas) momento en que la madre fue separada de sus crías.

Después del destete las crías recibieron una dieta balanceada y las respectivas soluciones que habían recibido las madres por un periodo de 28 días más.

2.6 Evaluación de aprendizaje y memoria

Terminado el tratamiento las crías fueron sometidas a la prueba de Laberinto espacial de Morris (Morris, 1984) ⁽⁵³⁾. Las pruebas correspondientes se realizaron en la piscina circular, pintado de blanco en su interior. La piscina fue llenada con agua (T° del agua = 21°C) a una altura de 32,5 cm con la finalidad de ocultar la plataforma de plástico. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes: noreste, noroeste, sureste y suroeste, delimitados con pabito por encima de la superficie de la piscina, cada cuadrante estaba asociado a una señal que incluían a la mesa, la pared, la ventana y al experimentador.

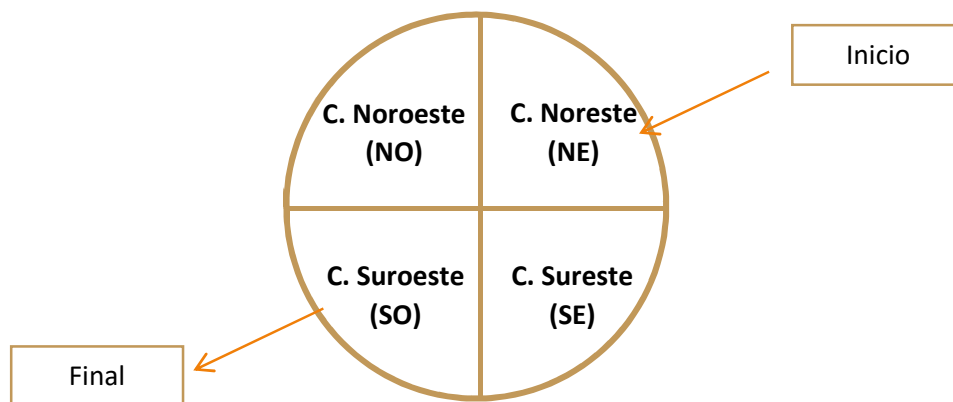


Figura 1: Cuadrantes del Laberinto acuático de Morris

2.6.1 Aprendizaje

El ensayo consistió en colocar a la rata en la posición de inicio (cuadrante noroeste).

Luego se registró el tiempo (s) en que la rata demoró en llegar a la plataforma ubicada en el cuadrante sureste (**tiempo de latencia**).

Si la rata encuentra la plataforma, antes de los 30 segundos, esta se dejó en ella por 20 segundos más, con la finalidad de que la rata reconozca el lugar de protección (**aprendizaje**).

Luego el animal es retirado de la piscina, secado y colocado en una jaula durante 1 minuto, antes del nuevo intento.

En el caso de que la rata no encontrara la plataforma a los 30 segundos, esta fue colocada por el experimentador en la plataforma por un lapso de 20 segundos y posteriormente tratada de la misma manera que aquellas que encontraron la plataforma.

El ensayo fue repetido por tres días consecutivos de entrenamiento.

2.6.2 Memoria

Al cuarto día se realizó con los mismos animales del experimento de aprendizaje, la prueba de memoria.

Previamente se retiró la plataforma, la rata fue ubicada en el cuadrante de inicio (noreste), luego se registró el tiempo en que el animal permaneció nadando en el cuadrante correcto (suroeste).

Para calcular el tiempo de permanencia se empleó una cámara de video ubicada en la parte superior y central de la piscina, esta grabó el recorrido de la rata por dos minutos.

2.7. Determinación de los Marcadores de Estrés Oxidativo

Concluida las pruebas en el Laberinto de Morris (3.6) las ratas fueron anestesiadas con vapor de éter dietílico en una campana de vidrio y luego sacrificadas por dislocación cervical, posteriormente la masa encefálica se removi6. Todo el cerebelo y el hemisferio derecho del cerebro fueron utilizados para el análisis histol6gico mientras que el hemisferio izquierdo fue conservado a una temperatura $< 4^{\circ}\text{C}$ hasta la preparaci6n de los homogenizados respectivos.

Para la determinaci6n de los marcadores bioquímicos se prepar6 los siguientes homogenizados:

Homogenizado para lipoperoxidaci6n:

Se pes6 $0,158 \pm 0,016$ g de tejido de cerebro y se homogenizo a un volumen final de 2 mL con buffer fosfato 0,01 M pH 7,4.

Homogenizado para GSH

Se pes6 $0,158 \pm 0,016$ g de tejido de cerebro en un volumen final de 2 mL con EDTA 0,02 mol/L.

2.7.1 Determinaci6n de Glutati6n (GSH)

Fundamento

La oxidaci6n del GSH por el ácido 5,5-ditiobis (2- nitrobenzoico) (DTNB), produce la formaci6n de un mol de ácido 2-nitro-5- tiobenzoico (TNB), que fue leído a 412 nm.

Protocolo

Se tom6 1 mL del homogenizado en un tubo de centrifuga y 0,4 mL de TCA al 50 %, se mezcl6 y dej6 reposando por un periodo de 15 minutos, luego se centrifug6 a 4000 RPM por 5 min. Se tom6 0,5 mL del sobrenadante y se agreg6 2 mL del buffer TRIS 0,4 mol/L, y pH 8,9, luego se ańadi6 0,025mL de DTNB 0,01 mol/L y se mezcl6. Finalmente fue leída la muestra a 412 nm antes de los 5 minutos. Se prepar6 una curva estándar con glutati6n.

Los cálculos de concentración se determinarán mediante la siguiente fórmula:

$$GSH \mu g / g = \frac{FC \times (ABS MP - Bt) \times VH \times Vrxp \times VRf}{Wc \times Vsn}$$

FC: 65,676 μ mol / mL

ABS (MP-BI): absorbancia de la muestra problema restado del blanco reactivo.

VH : volumen del homogenizado

Vrxp : volumen de la reacción precipitante

VRf : volumen de la reacción final

Wc : peso del tejido cerebral

Vsn : volumen del sobrenadante

2.7.2 Determinación de Lipoperoxidación:

Fundamento

El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación de los ácidos grasos perteneciente a las membranas celulares, mediante el cual reacciona con los dos moles del ácido 2-tiobarbitúrico para formar un complejo de color rosado, el cual presenta una absorción máxima a los 535 nm, la intensidad de esta coloración será proporcional al grado de oxidación de los ácidos grasos.

Protocolo

En un tubo con tapa, se colocó 0,4 mL del homogenizado y se agregó 0,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, el cual fue sometido a ebullición (100 °C) en baño María por 10 minutos.

Luego se retiró y enfrió con agua de caño. Posteriormente se le agregó 1,2 mL de ácido 2- tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% en HCl 0,25 N y se llevó nuevamente a baño María a 100 °C por 20 minutos, se enfrió y centrifugó por 5 minutos a 4000 RPM, y al final se leyó en el espectrofotómetro a 535 nm.

Los cálculos de concentración se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$[TBARS \text{ nmol/mL}] = \frac{ABS(MP - Bl) \times V_{Rx} \times VH \times 10}{\epsilon \times l \times V \times W}$$

V_{Rx} : volumen de la reacción

ϵ : coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

V : volumen del homogenizado para reacción.

l : longitud e la cubeta.

VH : volumen del homogenizado.

W : peso del tejido para el homogenizado.

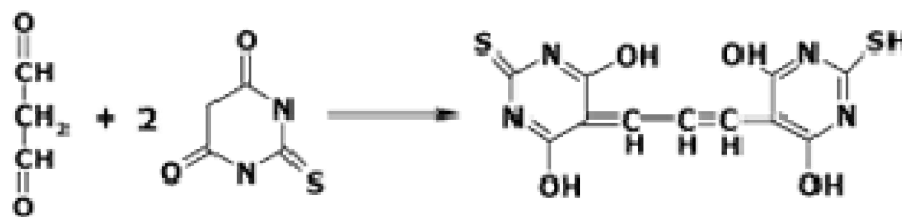


Figura 2: Reacción de TBA con 2 MDA que forma el complejo coloreado a 535 nm.
Analytical Methods for Resolving Data from TBA₂-MDA Reaction Mixtures

2.8 Estudio Histopatológico

Para realizar el estudio histopatológico del cerebro y cerebelo, los tejidos fueron fijados en formol neutro al 10% tamponado con NaCl al 0,09 %, posteriormente se realizó los cortes en el Instituto de Patología de la UNMSM – Sede Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Para la lectura de las láminas se utilizó la tinción de Hematoxilina-eosina el cual consiste en la tinción de los núcleos mediante la hematoxilina previamente oxidada , es decir transformada en hemateína, a la cual se agrega una sustancia mordiente, teniendo en cuenta que las mordientes son sustancias que facilitan la fijación del colorantes sobre los tejidos, actuando como una sustancia intermediaria, el mordiente se aplica antes de la utilización de la solución colorante, a esta combinación entre la mordiente y el colorante se le denomina “*laca*” para el cual se utilizan sales metálicas de aluminio , plomo o hierro.

Los núcleos se van a colorear de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro.

La Eosina se utiliza como colorante de fondo o de contraste en unión con los colorantes de núcleos como la hematoxilina, por tanto la tinción del citoplasma y el material extracelular se realiza gracias a la eosina confiriéndole diversos grados de color rosado.

La lectura de las láminas fueron realizada por el Dr. José Ernesto Ráez Gonzales, el cual evaluó la corteza, el área límbica, los núcleos basales y células de la glía en caso de las láminas de cerebro mientras que en las láminas de cerebelo evaluó, la meninge, corteza, la capa granulosa y células de Purkinje.

2.9. Análisis de datos

Los datos obtenidos del diseño experimental fueron ingresados y ordenados en una hoja de cálculo de MS-Excel 2010. Luego fueron procesados mediante el programa estadístico SPSS 20 para un análisis descriptivo como el promedio aritmético y desviación estándar. Se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para contrastar la normalidad de los datos y así seleccionar las estadísticas más adecuadas. Al tener la muestra una distribución normal se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de medias para más de dos muestras independientes.

2.10. Consideración Ética

El presente estudio se realizó bajo los principios de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar. ⁽⁵⁴⁾

III. RESULTADOS

3.1. Consumo promedio de solución de tartracina

Diariamente se evaluó el volumen de la solución de tartracina consumida por cada rata preñada. El grupo I consumió $36,5 \pm 12,6$ mL de la solución por día, el grupo II llegó a consumir $39,9 \pm 13,3$ mL y finalmente el grupo III $31,8 \pm 9,1$ mL.

En el periodo de lactancia (28 días) no se pudo calcular el volumen de consumo debido a que la madre se encontraba en la misma jaula que sus crías.

Pasado los 28 días de lactancia se evaluó el consumo dividiendo el volumen total consumido entre el número de ratas por jaula, dándonos los siguientes volúmenes, el grupo I consumió $15,6 \pm 9,7$ mL, el grupo II $12,09 \pm 5,7$ mL y el grupo III $13,7 \pm 6,2$ mL.

Aproximadamente representa un consumo de 12 mg/día/animal para el grupo II y el grupo III 140 mg mg/día/animal.

3.2. Aprendizaje

Se observó que el tiempo de latencia del grupo II no presenta diferencias significativas con el grupo I en los tres días de la evaluación. Mientras que el grupo III tuvo un tiempo de latencia mayor con respecto al grupo I y II en el primer día, sin embargo al segundo día el tiempo de latencia fue cercano al grupo I y para el último día de evaluación el grupo III presentó un tiempo de latencia significativamente mayor a los grupos I y II.

En cuanto al número de errores sobre el número de intentos que realizaron las ratas para llegar a la plataforma, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, sin embargo el grupo que presentó mayor número de errores fue el grupo III, el cual también tardó mayor tiempo en llegar a la plataforma (tiempo de latencia).

3.3 Memoria

Se observó que los grupos no mostraron diferencia significativa en el tiempo de permanencia en el cuadrante correcto.

Tabla 1: Tiempo de latencia y tiempo de permanencia en la prueba de Laberinto de Morris realizada a las ratas de segunda generación.

Grupo de tratamiento	APRENDIZAJE ^a Tiempo de latencia (s)				MEMORIA ^a Tiempo de permanencia (s)
	1 día	2 día	3 día	N° de errores / N° de intentos	4 día
Grupo I	50,63 ± 13,06	41,02 ± 13,47	26,46 ± 10,45	0,0556 ± 0,09	27,50 ± 6,44
Grupo II	48,32 ± 12,09	34,94 ± 21,69	26,18 ± 10,00	0,0509 ± 0,08	25,52 ± 4,49
Grupo III	85,19 ± 19,45 ^{bc}	43,23 ± 14,98	41,08 ± 12,37 ^{cd}	0,0880 ± 0,11	23,86 ± 4,90

(a) Media ± DE

(b) $p < 0,01$ comparado con el grupo I

(c) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(d) $p < 0,05$ comparado con el grupo I

(s) segundos

3.3 Marcadores de estrés oxidativo

Niveles de glutatión (GSH) y lipoperoxidación en tejido cerebral

Se evidenció que después del tratamiento con tartracina, los niveles de glutatión (GSH) pertenecientes al grupo II fueron similares con respecto al grupo I. Con respecto al grupo III fue significativamente menor en comparación a los grupos I y II ($p<0,05$).

Igualmente se observó que los niveles de lipoperoxidación expresados en especies reactivas al ácido 2-tiobarbiturico (TBARS) en el tejido cerebral del grupo II no mostraron diferencia significativa con el grupo I.

La administración al 1% de tartracina causó un mayor nivel de TBARS (lipoperoxidación) de forma significativa, en comparación con el grupo I ($p<0,05$)

Se observó también que los niveles de TBARS mostraron valores menores en el grupo II en comparación al grupo III ($p<0,01$)

Tabla 2: Glutatión (GSH) y Lipoperoxidación en homogenizado de cerebro de ratas de segunda generación según grupo de tratamiento

Grupo de Tratamiento	GSH ^a	Lipoperoxidación ^a
	µg/mL/g de tejido	nmol/g de tejido
Grupo I	987,59 ± 19,27	14,10 ± 2,58
Grupo II	1044,97 ± 62,55	14,25 ± 2,15
Grupo III	884,78 ± 32,54 ^{bc}	17,18 ± 2,30 ^{cd}

(a) Media ± DE

(b) $p<0,01$ comparado con el grupo II

(c) $p<0,01$ comparado con el grupo I

(d) $p<0,05$ comparado con el grupo I

3.4 Estudios histopatológicos del tejido nervioso

Grupo I: En los cortes histológicos del hemisferio cerebral izquierdo se observó el área de la corteza conservada (Figura 3) y en proporción igual con la capa granulosa, así mismo la zona límbica no presentó alteraciones en su estructura, en cuanto a los núcleos basales y células de la glía se observó de apariencia normal, sin embargo cabe mencionar que dos de las seis muestras, presentaron edemas discretos en el núcleo de la base (Figura 4).

Con respecto a las muestras de cerebelo se observó un número normal de células de Purkinje, de 10 a 13 por campo, los cuales se presentó de forma homogénea (Figura 5), sin embargo en la capa granulosa algunas muestras presentaron edemas de menor grado, y en una de ellas se observó disminuida la capa granulosa en proporción a la corteza, siendo esta última de apariencia normal y sin alteraciones.

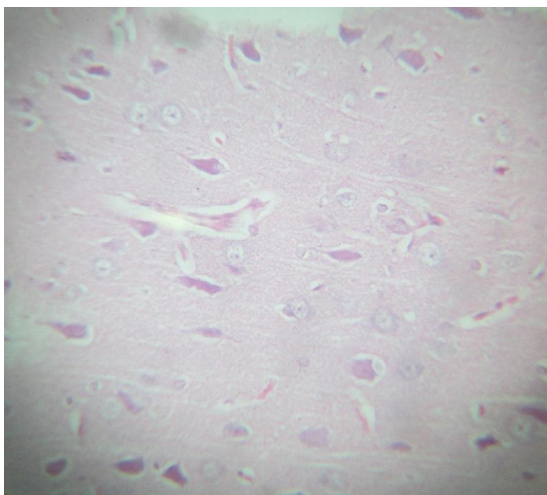


Figura 3: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo I (sin tratamiento) se observa las células del núcleo de la base sin ninguna alteración. Tinción H-E 40 x'.

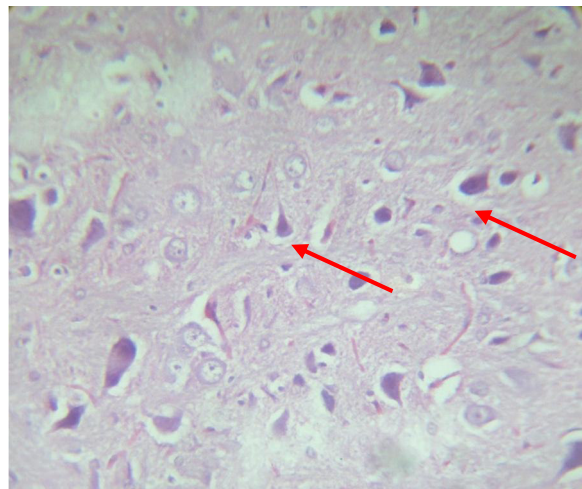


Figura 4: Microfotografía en la zona límbica del grupo I (sin tratamiento) se observa un discreto edema alrededor de las células del núcleo de la base (flecha). Tinción H-E 40 x'.

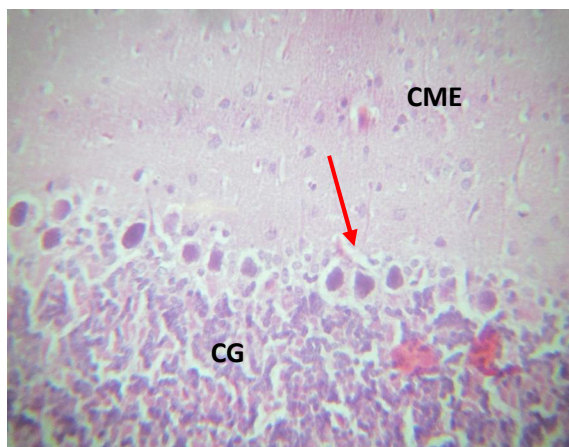


Figura 5: Microfotografía del cerebelo del grupo I (sin tratamiento) presenta la capa granular y la capa molecular externa en condiciones normales, al igual que las células de Purkinje se observan de igual forma y en buena cantidad (flecha). Tinción

Grupo II: Las muestras del hemisferio cerebral izquierdo en su mayoría presentaban un discreto edema, solo dos de ocho presentaron un edema más pronunciado, observándose alrededor de las células de la glía, las neuronas piramidales y la sustancia blanca (Figura 8). Se evidenció también una ligera congestión en la meninge pero solo en una de las láminas.

En cuanto al cerebelo se observó un mínimo nivel de edema en las células de la granulosa (tres de ocho), pero estas se encontraban bien orientadas y sin lesión alguna, igualmente se presentó edema a nivel de la corteza (dos de ocho) se encontró también que el número de células de Purkinje estaban conservadas (seis de ocho) (Figura 7), sin embargo en algunas muestras se observó una gran disminución de las células de Purkinje (menor a 6 Purkinje por campo) y una desigualdad (forma y tamaño) entre ellos, con una marcada poiquilocitosis e hipoplasia (Figura 6) ; algunos cortes del tejido solo mostraron pequeños edemas a nivel de las células granulosas y de la corteza.

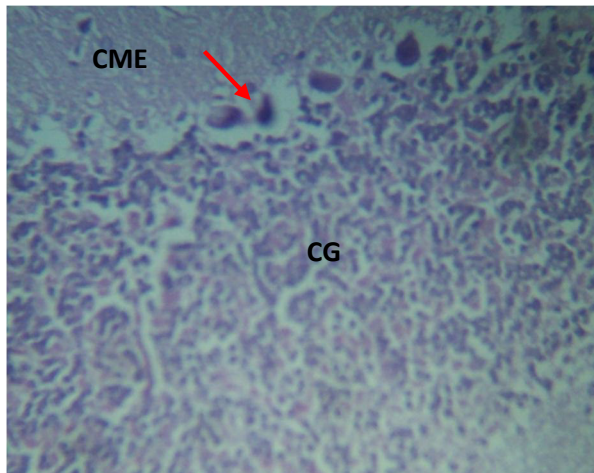


Figura 6: Microfotografía del cerebelo del grupo II (0,1 %) presenta un discreto edema en la capa granular (CG) y en la capa molecular externa (CME), las células de Purkinje se observan disminuidas y con ligera anisocitosis (flecha). Tinción H-E 40 x'.

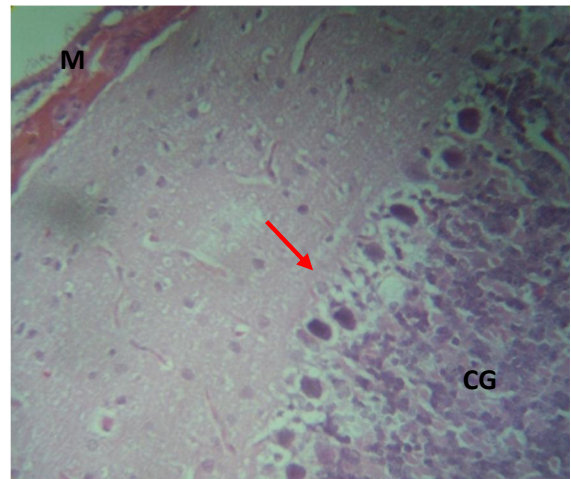


Figura 7: Microfotografía del cerebelo del grupo II (0,1 %) presenta un discreto edema en la capa granular (CG), sin lesión, también se observa la meninges (M) ligeramente congestionada y las células de Purkinje sin ninguna alteración anisocitosis. Tinción H-E 40

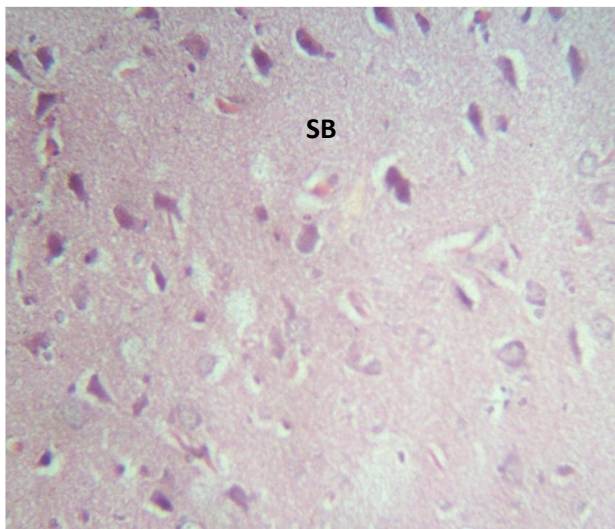


Figura 8: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo II (0,1%) se observan las células del núcleo de la base con edema leve, al igual que en la sustancia blanca (SB). Tinción H-E 40 x'.

Grupo III: En su totalidad los cortes referentes al cerebro mostraron edema en diferentes grados, la mitad de las muestras presentaron discretos edemas en la zona límbica y en la sustancia blanca, mientras que el resto presentaron edemas de grado moderado en el cuerno de Amón (Figura 11) y en las células de la base, mientras que en las neuronas y células de la glías se observaba con mayor intensidad el edema. También se observó gran congestión de la meninge en tres de las ocho muestras observadas y una de ellas presentó hipertrofia de las neuronas. En referencia a los cortes de cerebelo la mitad presentó células Purkinje disminuidas en cantidad (menor a 6 Purkinje por campo) en cuanto a la forma y tamaño, se observó poiquilocitosis y anisocitosis (tres de ocho), (Figura 10), en la misma proporción se observó hiperplasia e hipoplasia en las células de la capa molecular externa. En la mitad de las muestras se observó edemas leves y el resto con edemas de grado moderado que se localizaron sobre todo en la capa granulosa y células de Purkinje.

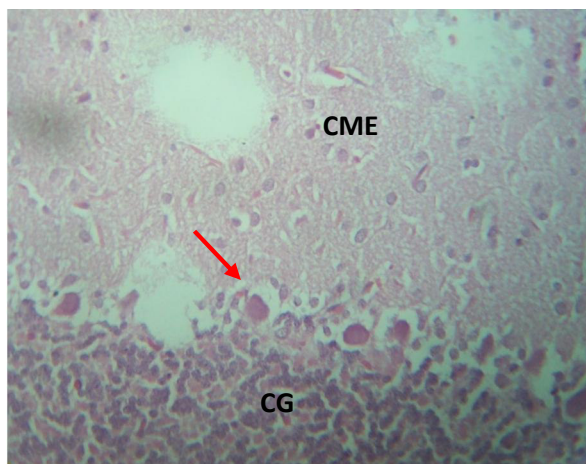


Figura 9: Microfotografía del cerebelo del grupo III (1,0 %) presenta edema en la capa granulosa (CG) y en la capa molecular externa (CME), las células de Purkinje se observan disminuidas y con edema (flecha). Tinción H-E 40 x'.

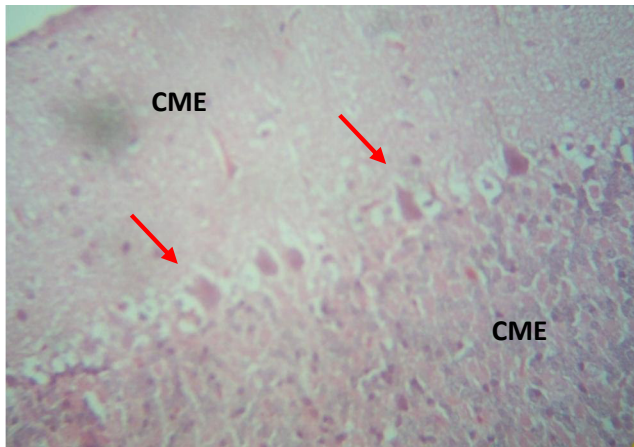


Figura 10: Microfotografía del cerebelo del grupo II (1,0 %) la capa granular (CG) se observa rara y las células de Purkinje se encuentran disminuidas, con anisocitosis y poikilocitosis (flecha). Tinción H-E 40 x'.

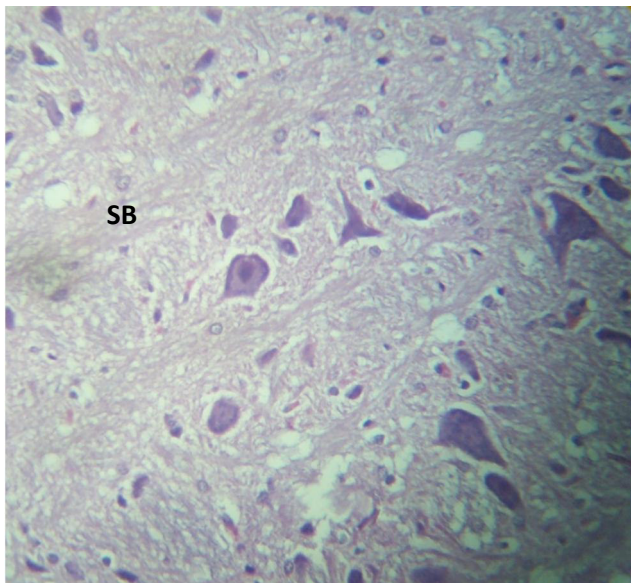


Figura 11: Microfotografía del cuerno de Amón del grupo III (0,1%) se observan las células del núcleo de la base y de la glía con edema moderado y en la sustancia blanca (SB) se pueden observar células espumosas. También se aprecia hipertrofia neuronal. Tinción H-E 40 x'.

IV. DISCUSIÓN

Los colorantes alimentarios son ampliamente utilizados en la actualidad para mejorar la presentación a un producto alimenticio o restaurar el color perdido de los alimentos, ya que el aspecto organoléptico, sobre todo el visual, cumple un papel fundamental al momento de la elección de un producto o un alimento.

Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio se observó un mayor tiempo de latencia de aprendizaje en el grupo III, en comparación con el grupo I y II y en cuanto a la memoria no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado por Yonglin.et al., en el año 2011, donde se observaron tiempos de latencia mayores en los grupos que recibieron el colorante por 30 días, a la dosis de 700 mg/kg, vía oral. En cuanto al estudio de memoria tampoco se evidenció diferencias significativas. Ellos sugieren que el colorante podría inducir notablemente un deterioro en el aprendizaje y la memoria en ratones, cuando el colorante es administrado por un período prolongado de tiempo. ⁽⁴⁷⁾

Arnold et al., halló que el consumo de tartracina afecta a minerales como el hierro y el zinc. El zinc actúa como cofactor en el metabolismo de sustancias endógenas como neurotransmisores, prostaglandinas, melatonina y dopamina de forma directa o indirecta ⁽⁵⁵⁾. La deficiencia de este mineral causa varios trastornos como la hiperactividad y otros cambios de comportamiento en los animales ⁽⁵⁶⁾, mientras que el hierro permiten el desarrollo y la actividad metabólica de múltiples procesos a nivel cerebral, como es la mielinización, así mismo afecta la regulación y la conducción de neurotransmisores como la serotonina, la dopamina y al ácido gamma-aminobutírico (GABA). ⁽⁵⁶⁾

La alteración de los receptores y transportadores de dopamina, compromete en los niños las respuestas afectivas y el funcionamiento cognoscitivo, mientras que los receptores GABA están relacionados a la coordinación de patrones de movimiento y memoria ⁽⁵⁶⁾.

En el presente estudio se observó en el grupo III, el cual recibió tartracina al 1%, agresividad e hiperactividad y disminución en el consumo de líquidos durante el tiempo que duró el tratamiento a las ratas preñadas.

Resultados similares fueron reportados por Mervat y Heba (2011), a la concentración de 1%, y a una mayor concentración (2,5%) observaron un comportamiento antisocial, síntomas de ansiedad, hiperactividad y depresión en ratas tratadas por un periodo de 16 semanas. Este estudio menciona que posiblemente el trastorno de hiperactividad observado se deba al efecto quelante de la tartracina, (sobre ciertos cationes divalentes) el cual ocasiona una disminución en minerales como el zinc ⁽³⁵⁾.

Este efecto quelante de la tartracina fue demostrado con anterioridad por Ward et al., (1990) los cuales reportaron una disminución del zinc sérico en niños con diagnóstico de hiperactividad y también en niños de la edad de 8 a 13 años tratados con tartracina (con y sin diagnóstico de hiperactividad), sin embargo esta diferencia fue más evidente en el grupo con hiperactividad que consumieron la tartracina y además se reportó un incremento en la excreción urinaria de zinc ⁽⁵⁷⁾

Ward menciona que la tartracina podría actuar como un agente quelante mediante la unión con el zinc disponible en sangre, situación que es crítica en los niños hiperactivos que ya presentan niveles bajos en zinc, y por lo tanto induciría un aumento en la excreción urinaria de zinc ⁽⁵⁷⁾.

Otros resultados reportados por Donna Mc (2007) corroboran la relación del consumo de los colores artificiales o el benzoato sódico (o ambos), dan como resultado un aumento de la hiperactividad en niños de 3 años y 8/9 años de edad y que dentro de los colorantes con mayor influencia sobre los niños, sería la tartracina ⁽⁵⁸⁾.

Así mismo, Sharma, en el 2009 demostró que el hierro también es quelado por la administración de tartracina, en un estudio en la que se administró tartracina por 35 días, en dos dosis de 0,2 y 0,4 mg/kg a ratas hembras adultas, los resultados

demonstraron que ambas dosis redujeron los niveles de hemoglobina, hematocrito, recuento total de eritrocitos y recuento total de leucocitos ⁽⁵⁹⁾.

Este mismo autor también realizó dos estudios en distintos años, con la combinación de diferentes colorantes y tartracina obteniendo resultados similares, es decir disminución en las concentraciones de hemoglobina y los recuentos de glóbulos rojos ⁽⁶⁰⁾ ⁽⁶¹⁾.

Hay que mencionar que el estudio de Visweswaran B. (2012) sobre el estrés oxidativo causado por la tartracina en testículos de ratas, observó una disminución significativa en los niveles de zinc y cobre en los grupos que recibieron tartracina, pero en caso del hierro y el manganeso se observó un aumento en comparación con el grupo control ⁽⁴⁶⁾.

Los hallazgos permitirían sugerir que la acción quelante de la tartracina influiría en el mecanismo del aprendizaje y memoria.

Bajo las condiciones experimentales de este estudio se evidenció que los niveles de glutatión (GSH) disminuyó en el grupo III, el agotamiento del GSH nos indicaría probablemente la participación de la enzima glutatión peroxidasa y éste como cofactor de la reacción, para convertir al radical libre H_2O_2 en agua.

Este resultado sugiere un posible daño por parte de radicales libres, producto del estrés oxidativo causado por el colorante. Se sabe que el GSH tiene un rol importante en la protección contra el estrés oxidativo, siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, por tanto al verse afectada los niveles de GSH, múltiples moléculas serían afectadas. ⁽⁶²⁾ ⁽⁶³⁾

Es bien conocido que los radicales libres atacan tanto proteínas como lípidos y provocan una reacción en cadena de lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular. ⁽⁶²⁾ ⁽⁶³⁾. En el presente estudio se observó en el grupo III, un aumento en los valores de lipoperoxidación (MDA). Estos resultados nos sugieren que la producción del H_2O_2 sería el responsable del daño a la membrana celular.

Los minerales como el hierro y el zinc, que al parecer son los más afectados por el consumo de tartracina, no solo son fundamentales para un adecuado desarrollo de órganos, en especial el desarrollo cerebral, sino que también son sustancias claves para enzimas antioxidantes, como la SOD dependiente de Cu/Zn. En donde la deficiencia de Zn está relacionada con niveles alto de malondialdehído (MDA), indicador de lipoperoxidación ⁽⁶⁴⁾, en el presente estudio se observó en el grupo III, un aumento en los valores de lipoperoxidación (MDA) probablemente por ejercer la tartracina un efecto quelante sobre ciertos minerales divalentes.

Estudios mencionados anteriormente indican que los compuestos azoicos, entre ellos la tartracina, pueden llegar al intestino directamente después de la ingestión oral, el cual está expuesto a la acción de enzimas digestivas y microflora ⁽⁶⁵⁾, Mustafa realizó un estudio el año 2014 con la tartracina y eritrosina, reportando que los aditivos mencionados son catalizados por azoreductasas y peroxidasas, producto de estas reacciones se forman radicales de semiquinona y aminas aromáticas, el cual generaron radicales superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilo (OH^\cdot) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), estos ROS posiblemente debilitan la principal defensa antioxidante celular y por tanto se presentan trastornos relacionados con el estrés oxidativo. ⁽⁶⁶⁾

Valentovic et al., (2002) demostraron que las aminas aromáticas son posiblemente responsables de los efectos endotóxicos y carcinógenos de los colorantes azoicos. Así mismo reportó una disminución significativa en los niveles de GSH en tejido renal, esta reducción del GSH también se ha observado a nivel hepático después de la administración de tartracina en altas dosis (500 mg/kg). ⁽⁶⁷⁾

Visweswaran B y Krishnamoorthy (2012) observaron que el tratamiento a la dosis de 72 mg/kg/día por un periodo de 60 días causó una disminución de la actividad enzimática de super

óxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) y también de los cofactores como el zinc y cobre, sin embargo las concentraciones de hierro y manganeso aumentaron en el tejido testicular. El estudio sugiere que frente a una disminución de la actividad de las enzimas

antioxidantes y a sus cofactores causarían un aumento de especies reactivas de oxígeno, generando el estrés oxidativo. ⁽⁴⁶⁾

Similar hallazgo encontraron Yonglin Gao et al., en el 2011, donde evaluaron las enzimas antioxidantes en el cerebro de ratas, tratadas con tartracina a diferentes concentraciones (150 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg) por un periodo de 30 días, observándose una disminución de la actividad de la catalasa, glutatión peroxidasa (GSH-Px), y la superóxido dismutasa (SOD), así como un aumento en el nivel de malonaldehído (lipoperoxidación), en los grupos tratados con 250 mg/kg y 500 mg/kg, el estudio refiere que estos cambios son consecuencia del daño oxidativo que causa el colorante sobre el cerebro. ⁽⁴⁷⁾

A nivel cerebral existen estudios que han evaluado la concentración de GSH y sistemas compensatorios de este antioxidante, se ha observado que el GSH es una de las defensas antioxidantes que más se ve afectada ya que los aminoácidos que lo componen (cisteína, glicina, glutamato) son sustrato de neurotransmisores, en el caso de un recién nacido se ha comprobado que el GSH aumenta debido a un cambio de ambiente, del útero hipóxico a un ambiente relativamente hiperóxico, ello con la finalidad de atenuar los efectos del estrés oxidativo causado por la generación de ROS en el cerebro del recién nacido durante un período de tiempo variable, sin embargo el sistema antioxidante eventualmente se verá abrumado si el daño cerebral se mantiene durante un largo período ⁽⁶⁸⁾

Los estudios histológicos mostraron edema en los tres grupos, su presencia está justificada por Montero y Hurtado (2013). Según mencionan, las ratas que tuvieron muerte por el método de dislocación cervical, presentaron edema cerebral, a nivel microscópico ⁽⁷⁷⁾, esto explicaría los edemas leves observados en los grupos I y II.

El edema puede también estar relacionado al estrés ocasionado por la prueba del laberinto de Morris, también se ha reportado en ratas sometidos a nado forzado, donde se evidenció edema vasogénico en la neocorteza, cerebelo e hipocampo. ⁽⁷⁰⁾

Los cambios histológicos en los grupos II y III fueron de mayor severidad, las lesiones se observaron principalmente en las células de la glía, las neuronas piramidales y la sustancia blanca, así mismo se evidencia una mayor congestión en

las meninges, donde guarda relación directa entre las concentraciones de tartracina y la severidad de los edemas. Estas lesiones pueden originarse por daño a nivel de la barrera hematoencefálica (BHE), el cual es denominado edema vasogénico, que es un tipo de edema del sistema nervioso central (SNC) caracterizado por un exceso de líquido, este líquido extravasado se difunde por la sustancia blanca de manera progresiva, el cual es proveniente de las arteriolas que irrigan el tejido nervioso, ello refleja una alteración patológica en la permeabilidad de la pared de los capilares arteriales. Las arterias pertenecientes al SNC están recubiertos por la BHE que regula el pasos de sustancias como CO₂ y agua, por lo tanto para que exista un edema vasogénico es necesario que haya un daño en esta barrera ⁽⁷⁰⁾

En este estudio la administración de la tartracina se inició desde la gestación y continuó durante por 56 días postnatal. Durante el periodo gestacional ocurre el desarrollo de la BHE y de forma paralela el desarrollo del SNC, proceso que continua después del nacimiento. Por tanto cualquier estímulo adverso durante el periodo perinatal puede retardar la maduración de la BHE, si se retarda el desarrollo de esta barrera, los agentes tóxicos fácilmente pueden atravesar desde el torrente sanguíneo y pueden afectar el funcionamiento de neuronas y neuroglía, dañando las estructuras nerviosas que conllevan a deficiencias de aprendizaje, memoria o movimiento. ^{(70) (71)}

El edema encontrado en los grupos II y III, también puede deberse a un origen citotóxico. Según M. Esqueda, dicha alteración está relacionado a la la permeabilidad de la membrana celular, de forma que las moléculas de agua procedentes del espacio intersticial, ingresan al citoplasma, de manera incontrolada, provocando hinchazón de las células; el edema citotóxico afecta fundamentalmente a las neuronas, motivo por el cual la sustancia gris aparece difuminada en imágenes de tomografía axial computarizada (TAC), pero también se ha observado la presencia de edema en la glía y en el endotelio capilar. Dicho autor indica que los cambios observados se presentan en los primeros momentos después de la agresión, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica permanece intacta en dicho periodo, sin embargo con el transcurso del tiempo, el endotelio capilar también se destruye y se produce edema vasogénico. ⁽⁷²⁾

En los dos grupos de tratamiento (grupo II y grupo III) se observó una disminución de las células de Purkinje y alteraciones en su forma y tamaño como poiquilocitosis y anisocitosis, ello se encontró en mayor número en el grupo III.

No existen estudios sobre la tartracina en cerebelo a nivel histológico para poder comparar estos resultados, sin embargo el estudio de Imane H. evaluó el efecto de la tartracina, mediante un consumo oral subcrónico de 13 semanas, donde se encontró que a nivel hematológico, la tartracina y el ácido sulfanílico indujeron un cambio morfológico en los eritrocitos de la rata, ⁽⁷³⁾ a pesar de que este estudio no se realizó en cerebelo, si nos da una evidencia de que el tratamiento con tartracina podría causar deformaciones de las células, como las observadas en las células de Purkinje de nuestro estudio .

Mehedi et al., (2013), también evaluaron el efecto de la ingesta sub-crónica de tartracina en el que los exámenes histológicos mostraron daños cerebrales, hepáticos y renales en animales tratados con dosis de 1 y 2,5%, mientras que en cerebro se observó una hiperplasia de las células gliales en el grupo tratado al 2,5%. En nuestro estudio se presentó algo similar, pero a nivel del cerebelo, donde se observó hiperplasia en las células de la capa molecular externa. ⁽⁷⁴⁾

V. CONCLUSIONES

- La administración de tartracina al 1% produjo una disminución del aprendizaje expresado en un tiempo de latencia mayor con respecto a los otros grupos de ratas de segunda generación.
- La administración de tartracina al 1% produjo una disminución significativa del GSH e incremento de lipoperoxidación en el tejido cerebral de ratas de segunda generación.
- La administración de tartracina causó daño en el tejido cerebral y en cerebelo en las ratas de segunda generación a las concentraciones de 0,1% y 1%.
- De lo observado en el presente estudio de investigación se infiere que la administración de tartracina produce un daño en la función cognitiva y el tejido cerebral (medidos por estrés oxidativo e histológico) en los tejidos de ratas de segunda generación en las concentraciones empleadas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio del efecto sinérgico de la tartracina y otros colorantes sobre la función cognitiva.
- Se recomienda realizar la cuantificación de la actividad enzimática de: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión oxidado y glutatión reducido.
- Realizar la determinación bioquímica de lipoperoxidación y GSH en el hipocampo y cerebelo.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS

- (1) Aguirre J, Escobar M, Chávez A. Evaluación de los patrones alimentarios y la nutrición en cuatro comunidades rurales. Salud Pública en México 1998; 40:398-407
- (2) Hernández L, Stern D, Tolentino L, Espinosa J, Barquera S. Consumo de agua en la población infantil y adolescente. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
- (3) Fabres Matias Exequiel. Consumo de golosinas snacks y bebidas carbonatadas en adolescentes de 10 a 12 años de dos colegios de la ciudad de Rosario. Marzo 2011.
- (4) Couriane Gouget. Peligro: Los aditivos alimentarios. La Guía indispensable para que no te envenenen más. España. Obelisco, 2008
- (5) León MT, Rueda MT, Castillo MD, León M, Ceballos R, Fernández S, et al. Estudio de los aditivos alimentarios y su repercusión en la población infantil. Medicina de Familia .2000; 1: 25-30
- (6) Restrepo G. Mauricio, et al. Sustitución de tartrazina por betacaroteno en la elaboración de bebidas no alcohólicas. Rev. Lasallista de Investigación. Vol 3 No 3 (Julio – Diciembre, 2006), p. 7 – 12
- (7) Toledo, MCF. Aditivos Alimentares in Fundamentos de Toxicología. Atheneu. Brasil. 1996. p. 405-39
- (8) Hirschbruch, Marcia D, Torres, Elizabeth A. F. S. Toxicología de Alimentos: Uma Discussão. Hig. Alim., vol. 12, no. 53, p. 21-25. 1998.
- (9) Walton K, Walker R, Van de Sandt JJ, Castell JV. The Application of In Vitro in the Derivation of the Acceptable Daily Intake of Food Additives. Food Chem Toxicol., 1999. vol. 37, p. 1175-1197
- (10) Park M, Park HR, Kim SJ, Kim MS, et al. Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. J Toxicol Environ Health A. 2009;72(21-22):1412-23

- (11) CODEX ALIMENTARIUS, Norma general del CODEX para los aditivos alimentarios. CODEX STAN 192-1995
- (12) Comisión de CODEX ALIMENTARIUS. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del CODEX sobre aditivos alimentarios 43ª Reunión Xiamen (provincia de Fujian), China, 14 al 18 de marzo de 2011 DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE EL USO DE LA NOTA 161 (Informe del gte sobre el uso de la Nota 161).
- (13) Marmitt S, Pirotta V, Stulp S. Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintéticos contendo diferentes corantes alimentícios. Química Nova, 2010. v. 33, n. 2, p. 384-88
- (14) Instituto Nacional de Estadísticas e Informática. Perú: Consumo per Cápita de los principales Alimentos 2008-2009
- (15) ASPEC. Publicidad de alimentos para niños y su influencia en la obesidad infantil ,2008.
- (16) Kaushik J, Narang M, Parakh A. Fast food consumption in children. Indian Pediatrics 2011; 48(17):97-101.
- (17) www.digesa.sld.pe/orientación/comunicado-tartracina.asp
- (18) Stephen D. Lockey. Allergic Reactions Due FD&C Dyes Used as Coloring and Identifying Agents in Various Medications. *Bulletin* (Lancaster General Hospital), September 1948.
- (19) Lockey SD. Allergic reactions due to F D and C Yellow No. 5, tartrazine, an aniline dye used as a coloring and identifying agent in various steroids. Ann Allergy. 1959 Sep-Oct; 17:719-21
- (20) Weltman JK, Szaro RP, Settipane GA. An Analysis of the Role of IgE in intolerance to Aspirin and Tartrazine. Allergy 1978;34:273-281
- (21) Du C, Sun D. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. Trends in Food Science & Technology 2004. 15: 230-249.
- (22) Pedreschi F, Aguilera J, Pyle L. Characterization and Kinetics of Potato Strips During Frying. Food Engineering and Physical Properties. Textural. 2004 66: 314-318

- (23) GSFA Online Database. Norma general del Codex para aditivos alimentarios 2009. <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/search.html>
- (24) Bonser GM, Bradshaw L, Clayson DB, and Jull JW. A further study of the carcinogenic properties of ortho-hydroxy-amines and related compounds by bladder implantation in the mouse, *Br. J. Cancer* 1956. 10, 539,
- (25) Russ R, Rau J, and Stolz A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000. 66, 1429-1434.
- (26) Trefouei J, Trefouel J, Nitti, F, and Bovet D., Active du p-amino-phenylsulfamide sur les infections streptococciques experimentales de la souris et du lapin, *C.R. Seances Soc. Biol.*, 120,756, 1935.
- (27) García JM, García FC. Fundamentos de Química Orgánica. Estructura y propiedades de los compuestos orgánicos (Manuales) Tapa blanda – 26 feb 2008
- (28) J. W. Daniel. The excretion and metabolism of Edible Food Colors. *Toxicology and applied pharmacology* .1962
- (29) Radomski JL, Mellinger TJ. The absorption, fate and excretion in rats of the water-soluble azo dyes, FD&C Red No. 2, FD&C Red No. 4, and FD&C Yellow No. 6. *J Pharmacol Exp Ther.* 1962 May; 136:259-66.
- (30) Jones R, Ryan AJ, Wright SE. The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man. *Food Cosmet Toxicol.* 1964 + Keiva S. Gomes et al., Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Sci. Technol (Campinas)* vol.33 no.1 Campinas Jan./Mar. 2013 Epub Mar 08, 2013
- (31) Ward NI, Soulsbury KA, Zettel VH, Colquhoun ID, Bunday S, and Barnes B . The Influence of the Chemical Additive Tartrazine on the Zinc Status of Hyperactive Children—a Double-blind Placebo-controlled Study, 1990, Vol. 1, No. 1 , Pages 51-57
- (32) Bender D. Non-nutritional uses of vitamin B6. *Br J Nutr*, 1999 :81: 7-20.
- (33) Patterson RM, Butler JS. Tartrazine induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 1982; 20 (4): 461-5.

- (34) Sasaki, YUF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K and Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.*, 2002; 519: 103-119
- (35) Mervat M, Heba S. The potential health of tartrazine and levels of hyperactivity, anxiety like symptoms, depression and anti-social behavior in rats. *Journal of American Science*, 2011; 1211: 1218.
- (36) Coleman M, Steinberg G, Tippet J, Bhagavan H N, Coursin D B, Gross M, Lewis C and Deveau L. A preliminary study of the effect of pyridoxine administration in a subgroup of hyperkinetic children: a double-blind crossover comparison with methylphenidate. *Biological Psychiatry*. 1979
- (37) Arnold LE, Isilvestro RA. Zinc in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of Child & Adolescent Psychopharmacology*. 2005.
- (38) Kozielc T, Starobrat-Hermelin B. Assessment of magnesium levels in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Magnesium Research*, 1997. 10, 143–148.
- (39) Delgado L, Betanzos G, Sumaya MT. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo *Investigación y Ciencia*, vol. 18, núm. 50, 2010, pp. 10-15.
- (40) Dorado C, Rugerio C, Rivas S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM Vol.46 No.6*, 2003.
- (41) Huanqui G.C., Oxidantes-antioxidantes en reumatología. *Revista Peruana de Reumatología*, 3(1), 35-40, 1997
- (42) Roche C.E. y Romero A.D. Estrés oxidativo y degradación de proteínas, *Medicina clínica*. 103(5), 189-196, 1994.
- (43) Dunkan, S. Farewell, A. Ballesteros, Radman M. and Nystrom T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors, *Proceedings of the National Academy of Science*, 97(11), 5746-5749, 2000.
- (44) Amin KA, Abdel Hameid H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol*. 2010 Oct; 48(10):2994-9.

- (45) Amin KA, Abdel Hameid H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol.* 2010 Oct; 48(10):2994-9.
- (46) B. Visweswaran and G. Krishnamoorthy. Oxidative Stress by Tartrazine in the Testis of Wistar Rats. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS)* ISSN: 2278-3008 Volume 2, Issue 3 (July-August 2012), PP 44-49
- (47) Yonglin G, Chunmei L, Jingyu S, Huaxian Y, Xiulin A, Haizhu J .Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. *J. Food Sci.* 2011; 76(67):T125-T129.
- (48) Silva KV, Goncalves MV, Ronielson F, Carvalho C, Peron A. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Sci. Technol (Campinas)* vol.33 no.1 Campinas Jan./Mar. 2013 Epub Mar 08, 2013
- (49) Mahfouz H and Al-Shammrani S. Protective action of vitamin C against mutagenic effects of synthetic food color tartrazine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.*2013; Vol. 7(35), pp. 2474-2483.
- (50) Moutinho ILD, Bertges LC and Assis, RVC. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow nº5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz. J. Biol.* 2007, 67(1): 141-145.
- (51) Argimon JM, Jiménez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3º Edición. 2004
- (52) Aguado L. Aprendizaje y memoria, Simposio de Neuropsicología básica. *Rev Neurol* 2001
- (53) Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11:47–60
- (54) Fuentes FM, Mendoza R, Rosales A , Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón; INS ,Lima 2008.
- (55) Stevens J, Kuczek T, Burgess R, Stochelski A and Galland L. Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. *Nutrition Reviews* Vol. 71(5):268–281

- (56) Gilda g. Stanco, M.D. Funcionamiento intelectual y rendimiento escolar en niños con anemia y deficiencia de hierro. Colombia Médica Vol. 38 N° 1 (Supl 1), 2007.
- (57) N. Ward, K. Soulsbury, V. Zettel The influence of the chemical additive tartrazine on the zinc status of hyperactive children-a double-blind placebo-controlled study. Journal of Nutritional Medicine (1990)
- (58) Donna Mc et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. Lancet. 2007 Nov 3;370(9598):1560-7.
- (59) Sharma A, Gautam, D., Goyal, R.P. Tartrazine Induced Haematological and Serological Changes in Female Swiss albino Mice, Musmusculus. Pharmacology online 3: 2009
- (60) Sharma A, Goyal RP, Chakravarty G, Sharma S. Heamatotoxic effect of chocolate Brown, a commanly used blend of permitted food colour on Swiss albino mice. Asian. J. Exp. Sci 2005a
- (61) Sharma S, Goyal RP, Chakravarty G, Sharma A. Orange red a permitted food colours induced haematological changes in Swiss albino mice, mus musculus. Bull. Pure App. Sci 2005b
- (62) María Martínez Sarrasague. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. Acta Bioquím Clín Latinoam 2006; 40 (1): 45-51
- (63) Denzoin L, Soracia A, Tapia M. Homeostasis del glutatión. Acta bioquím. clín. latinoam. vol.47 no.3 La Plata set. 2013
- (64) Loewen P.C. Bacterial catalases. In: Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses (ed. by J.G. Scandalios), pp. 273–308. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, New York .1997
- (65) King-Thom Chung,T George E. Fulk, Mary Egan. Reduction of Azo dyes by intestinal anaerobes. Applied And Environmental Microbiology, Mar. 1978
- (66) Mustafa Cemek, et al. Effects of Food Color Additives on Antioxidant Functions and Bioelement Contents of Liver, Kidney and Brain Tissues in Rats. Journal of Food and Nutrition Research, 2014 2 (10), pp 686-691, 2014.

- (67) Valentovic, MA, Ball, JG, Sun, H, Rankin, GO., Characterization of 2-amino-4,5-dichlorophenol (2A45CP) in vitro toxicity in renal cortical slices from male Fischer 344 rats. Toxicol. 172 (2), 2002.
- (68) Adams D., Lori JR, Aidman K, Ifeoma O, Howard S. Alzheimer and Parkinson disease brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. School of Pharmacy, and Department of Pathology. School of Medicine, University of Southern California, and Los Angeles County/University of Southern California Medical Center , 1991.
- (69) Montero T , Hurtado J. Presencia de lesiones histopatológicas relacionadas con el método de eutanasia . Hospital Militar Central "Dr. Luis Díaz Soto". La Habana, Cuba. 2012.
- (70) Pascual JM, González F , Prieto R , Cerdán S . La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central Rev Neurol ,2004
- (71) Esqueda M, et al. Edema cerebral I: fisiopatología, manifestaciones clínicas, diagnóstico y monitoreo neurológico. Med Int Méx 2014.
- (72) Imane Himri et al. A 90 day oral toxicity study of tartrazine, a synthetic food dye, in wistar rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 3, Suppl 3, 2011
- (73) Imane Himri et al. A 90 day oral toxicity study of tartrazine, a synthetic food dye, in wistar rats. International
- (74) Nabila Mehedi, et al. A thirteen week ad libitum administration toxicity study of tartrazine in swiss mice. African Journal of Biotechnology Vol. 12. 2013.

VIX. ANEXOS

INFORMACIÓN DEL ADITIVO ALIMENTARIO	
NOMBRE COMÚN	Tartrazina
COLOR ÍNDEX	19140
CEE N°	E102
DESCRIPCIÓN	Polvo o gránulos de color naranja claro
CARACTERÍSTICAS	
Fórmula química	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
Solubilidad	Soluble en agua ,escasamente soluble en etanol
Absorción mínima	424 nm
PUREZA	
Pérdida por secado a 135°	No más del 15%, junto con cloruro y sulfato calculado como sales de sodio
Materia insoluble en agua	No más del 0.2%
Plomo	No más de 2mg/Kg
Colorantes secundarios	No más del 1%
Aminas aromáticas primarias no sulfonadas	No más del 0,01% expresadas en anilina
Materias extraíbles con éter	No más del 0,2%